

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/30468 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 47/48, C08G 73/02, C12N 15/87 (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11317 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
1. Oktober 2001 (01.10.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 49 808.6 9. Oktober 2000 (09.10.2000) DE  
100 52 479.6 23. Oktober 2000 (23.10.2000) DE  
101 45 134.2 12. September 2001 (12.09.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIMON, Joachim [DE/DE]; Am Broichgraben 62D, 40589 Düsseldorf (DE). VOLLMER, Martin [DE/DE]; Treptower Str. 14, 51375 Leverkusen (DE). BETZ, Ulrich [DE/DE]; Im Johannistal 11, 42119 Wuppertal (DE). SCUDERI, Philip [US/US]; 7203 Crecent Ridge Drive, Chapel Hill, NC 27516 (US).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/30468 A1

(54) Title: COMPLEXES FOR TRANSFERRING NUCLEIC ACIDS INTO CELLS

(54) Bezeichnung: KOMPLEXE ZUR EINFÜHRUNG VON NUKLEINSÄUREN IN ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to complexes consisting of cationic polymers and nucleic acids, to the use of this type of complex for transferring nucleic acids into cells and organisms, to the use of said complexes as medicaments and to novel polymers that can be used to produce said complexes.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Komplexe aus kationischen Polymeren und Nukleinsäuren, die Verwendung solcher Komplexe zur Einführung von Nukleinsäuren in Zellen und Organismen, die Verwendung der Komplexe als Arzneimittel, sowie neue Polymere, die für die Herstellung der Komplexe verwendet werden können.

### Komplexe zur Einführung von Nukleinsäuren in Zellen

Die Erfindung betrifft Komplexe aus kationischen Polymeren und Nukleinsäuren, die Verwendung solcher Komplexe zur Einführung von Nukleinsäuren in Zellen, sowie die Verwendung der Komplexe als Arzneimittel. Die Erfindung betrifft auch neue Polymere, die für die Herstellung der Komplexe verwendet werden können.

Weiterführende Erfolge bei der therapeutischen Anwendung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) in vivo haben sich am Menschen bisher noch nicht realisieren lassen. Gründe hierfür liegen vermutlich in der begrenzten Expression der notwendigen genetischen Information, die wiederum durch eine unzureichende Effizienz des Gentransfers bzw. der Verfügbarkeit der zu exprimierenden Nukleinsäuren begründet ist. Daneben spielen Gründe wie die unzureichende Stabilität eingesetzter Transport- bzw. Vektorsysteme sowie unzureichende Biokompatibilität eine wichtige Rolle.

Besonders attraktiv ist die Möglichkeit einer oralen oder intranasalen Verabreichung von Nukleinsäuren zur Gentherapie oder Immunisierung (Page & Cudmore, Drug Discovery Today 2001, 6, 92-101). Hierbei ist ein Schutz der Nukleinsäuren vor einem Abbau durch Nukleasen essentiell. Insbesondere im Falle der Vakzinierung ist eine Exposition der Schleimhäute der parenteralen Applikation vorzuziehen, um eine Stimulation des MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) zu gewährleisten, welches in die immunologische Protektion der Schleimhäute involviert ist. Eine Verhinderung von Infektionen in diesem Bereich ist z.B. bei Pathogenen wie HIV (Humanes Immundefizienzvirus) oder HSV (Herpes Simplex Virus) von großer Bedeutung.

Virale Vektoren wie Retroviren oder Adenoviren bergen die Gefahr, inflammatorische oder immunogene Prozesse auszulösen (Mc Coy et al., Human Gene Therapy 1995, 6, 1553-1560; Yang et al., Immunity 1996, 1, 433-442).

Nicht-virale, synthetische Transportsysteme werden bislang als Alternative bearbeitet, zeigen jedoch noch nicht die gewünschten Eigenschaften. Biophysikalisch sind insbesondere auf Mischungen von Lipiden sowie gegebenenfalls weiteren zuge-  
mischten zellspezifischen Liganden basierende Systeme nur schwer oder unzurei-  
5 chend charakterisierbar und bergen weiterhin die Gefahr von dynamischen Struk-  
turänderungsprozessen bei Lagerung und Applikation. Insbesondere eine Applika-  
tionssicherheit als Voraussetzung für die Verwendung als Arzneimittel ist hierbei  
nicht gegeben.

10 Komplexe auf der Basis von synthetischen kationischen Polymeren haben daher eine  
bevorzugte Rolle sofern ihre strukturellen Merkmale reproduzierbar hergestellt und  
eindeutig charakterisiert werden können (M.C. Garnett, Critical Reviews in  
Therapeutic Drug Carrier Systems 1999, 16, 147-207).

15 Zahlreiche beschriebene Herstellungsverfahren von synthetischen kationischen Poly-  
meren zur Komplexherstellung führen zu undefinierten Produkten hinsichtlich des  
Verzweigungsgrades der Polymere und deren Mikrostruktur. Weiterhin sind zahl-  
reiche zur Transfektion eingesetzte Polymere nur durch sehr breite Molekular-  
gewichtverteilungen charakterisiert oder nur durch ihre Molekulargewichts-  
20 mittelwerte beschrieben.

Insbesondere Polyethylenimin (PEI), ein kationisches Polymer mit dreidimensio-  
naler, verzweigter Struktur, eignet sich zur Komplexierung und Kondensierung von  
Nukleinsäuren (W.T. Godbey, J. of Controlled Release 1999, 60, 149-160). In einer  
25 Reihe von in vitro Experimentalserien konnte die Eignung zum Einschleusen von  
Nukleinsäuren in Zellen gezeigt werden, wobei insbesondere Polymere mit niedrigen  
Molekulargewichten (LMW-PEI, LMW: low molecular weight) im Bereich um Mw  
2000 g/Mol hohe Aktivität zeigten (EP-A 0 905 254). Als Nachteil der verzweigten  
Polymere ist deren undefinierte Struktur zu werten.

30

Lineare Polyethylenimine hingegen können mit definierten Molekulargewichten hergestellt werden und wurden in zahlreichen Applikationen für in vitro und in vivo Gentransfer eingesetzt (WO 96/02655). Bemühungen, die Transfektionseffizienz der linearen Polyethylenimine zu verbessern, führten in zwei Richtungen (M.C. Garnett, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 1999, 16, 147-207):

- 1) Durch Einführung von hydrophilen Substituenten konnte einerseits die Wasserlöslichkeit der DNA/Polymer-Komplexe erhöht werden, und andererseits konnten die Komplexe hinsichtlich Proteinwechselwirkung inertisiert werden. Daneben wurden auch Blockcopolymere aus Polyethylenglykol und Polyethylenimin beschrieben.
- 2) Durch Einführung von zellspezifischen Liganden, meist hydrophilen Kohlenhydrat- oder Peptidstrukturen, konnte ein Targeting-Effekt erzielt werden.

Die Transfereffizienz der komplexierten Nukleinsäuren in Zellen hängt von vielen Faktoren ab, vor allem von der Wechselwirkung zwischen Komplexen und Zellmembranen, der Art des Zelltyps, der Größe der Komplexe und des Ladungsverhältnisses zwischen den Komponenten des Komplexes. Wenig ist über die Wechselwirkung zwischen Komplexen und Zellmembran sowie die Aufnahme in Zellen bekannt.

Eine erhöhte Wechselwirkung von hydrophob substituierten Polyethylenimininen mit Modellmembranen bestehend aus anionischen Phospholipiden konnte anhand eines Vergleichs von verzweigten unsubstituierten Polyethylenimininen mit substituierten Polyethylenimininen (Substitutionsgrad von bis zu 50 mol-% an Hexyl- bzw. Dodecyl-Alkylketten) gezeigt werden (D.A. Tirell et al., Macromolecules 1985, 18, 338-342).

Die Verwendung von hydrophob funktionalisierten Polyethylenimininen für die Komplexierung von Nukleinsäuren ist nur für Alkyl-substituierte Systeme beschrieben (WO 99/43752). Daneben konnte bei kationischen Polymeren auf Basis von Polyacrylaten gezeigt werden, dass hydrophobe Monomereinheiten die Transfektions-

effizienz erhöhen (M. Kurisawa et al., J. Controlled Release 2000, 68, 1-8). Für hydrophobisiertes Poly-L-Lysin mit 25 mol-% Stearyl-Einheiten konnte gezeigt werden, dass ternäre Komplexe aus Nukleinsäuren mit Lipoproteinen in Kombination mit diesen Polymeren zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz in Muskelzellen führen (K.-S. Kim, J. of Controlled Release 1997, 47, 51-59). In EP-A 0 987 029 sind Polyallylamine beschrieben, die optional lineare und verzweigte Alkylketten oder auch Arylgruppen tragen können.

Hydrophobisierte Polyethylenimine mit langkettigen Alkylresten wurden bereits in Form quaternärer vollständig alkylierter und damit hochgeladener Strukturen als Katalysatorsysteme in beispielsweise Esterspaltungen eingesetzt. Daneben wurden auch acylierte Strukturen zur Stabilisierung von Enzymen eingesetzt (US 4950596).

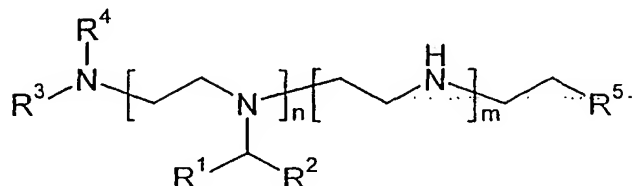
Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Komplexe, die ein in Wasser lösliches oder dispergierbares lineares kationisches Polymer mit hydrophoben Substituenten und zumindest eine Nukleinsäure umfassen.

Vorzugsweise stellt das Polymer ein Polyamin und besonders bevorzugt ein Polyethylenimin dar.

Die hydrophoben Substituenten können als Seitenketten oder endständig an dem Polymer angeordnet sein. Der Substitutionsgrad (prozentualer Anteil funktionalisierter N-Atome in der Polymerhauptkette) beträgt vorzugsweise zwischen 0,1 und 10 Prozent.

Als hydrophobe Substituenten kommen insbesondere Alkylketten, Acylketten oder Steroid-artige Substituenten in Frage. Besonders geeignet als hydrophobe Substituenten sind Acylketten. Des Weiteren kommen hydrophobe Substituenten in Frage, die durch Addition der Stickstofffunktionen der Polymerhauptkette an Isocyanate oder an  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen eingeführt werden können.

Ein vorzugsweise für die Komplexbildung verwendbares Polymer weist die folgende allgemeine Formel auf:



5

worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}]$ -Einheit

$\text{R}^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet und

10  $\text{R}^2$  Alkyl mit 1 bis 23 Kohlenstoffatomen, bevorzugt Alkyl mit 12 bis 23 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Alkyl mit 17 Kohlenstoffatomen, bedeutet,

und worin

15  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff und Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen, bevorzugt Alkyl mit 13 bis 24 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Alkyl mit 18 Kohlenstoffatomen, bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

20 wobei

$\text{R}^5$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist, beispielsweise Hydroxyl,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}$  oder  $\text{NR}_2$ , wobei die Reste R den Endgruppen  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  entsprechen können,

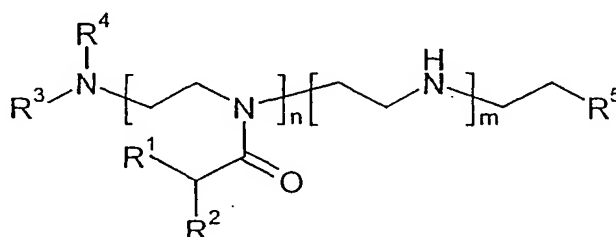
25

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250, bevorzugt im Bereich 250 bis 2250, besonders bevorzugt im Bereich 500 bis 2050,

liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , vorzugsweise  $0,01 < a < 0,05$  und besonders bevorzugt  $a = 0,03$ .

5 Dabei sind die Einheiten  $m$  und  $n$  keine Blockstrukturen, sondern statistisch im Polymer verteilt.

Ein weiteres vorzugsweise für die Komplexbildung verwendbares Polymer weist die folgende allgemeine Formel auf:



10

worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}]$ -Einheit

15  $R^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet und

$R^2$  Alkyl mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen, bevorzugt Alkyl mit 11 bis 22 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Alkyl mit 16 Kohlenstoffatomen, bedeutet,

und worin

20

$R^3$  und  $R^4$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff oder Acyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen, bevorzugt Acyl mit 13 bis 24 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Acyl mit 18 Kohlenstoffatomen, bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

25

wobei

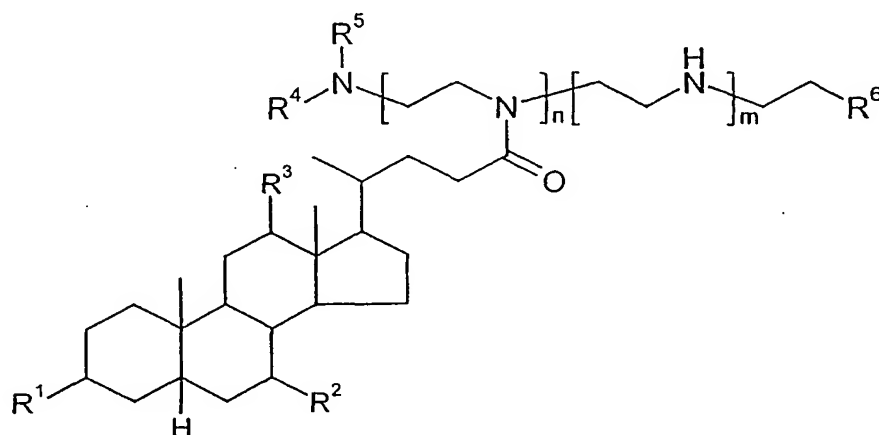
$R^5$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist, beispielsweise Hydroxyl,  $NH_2$ ,  $NHR$  oder  $NR_2$ , wobei die Reste  $R$  den Endgruppen  $R^3$  und  $R^4$  entsprechen können,

5 und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250, bevorzugt im Bereich 250 bis 2250, besonders bevorzugt im Bereich 500 bis 2050, liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , vorzugsweise  $0,01 < a < 0,05$  und besonders bevorzugt  $a = 0,03$ .

10 Dabei sind die Einheiten  $m$  und  $n$  keine Blockstrukturen, sondern statistisch im Polymer verteilt.

Das Polymer ist neu und als solches Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15 Ein weiteres vorzugsweise für die Komplexbildung verwendbares Polymer weist die folgende allgemeine Formel auf:



20 worin in jeder einzelnen  $[CH_2-CH_2-N]$ -Einheit

$R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  Wasserstoff oder Hydroxy bedeuten,

und worin



$R^4$  und  $R^5$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff oder Gallensäuren bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

wobei

5

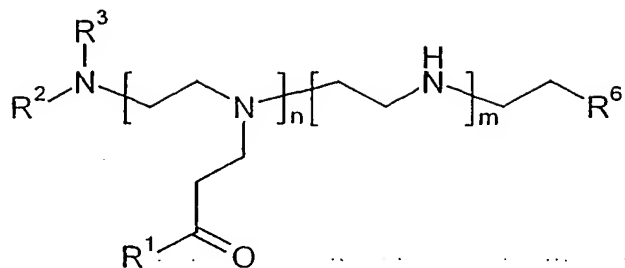
$R^6$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist, beispielsweise Hydroxyl,  $NH_2$ ,  $NHR$  oder  $NR_2$ , wobei die Reste  $R$  den Endgruppen  $R^4$  und  $R^5$  entsprechen können,

10 und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250, bevorzugt im Bereich 250 bis 2250, besonders bevorzugt im Bereich 500 bis 2050, liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , vorzugsweise  $0,01 < a < 0,05$  und besonders bevorzugt  $a=0,03$ .

15 Dabei sind die Einheiten  $m$  und  $n$  keine Blockstrukturen, sondern statistisch im Polymer verteilt.

Das Polymer ist neu und als solches Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Dabei sind im Hinblick auf das Steroid-Grundgerüst alle Stereoisomeren mitumfasst.  
20 Insbesondere können die Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  sowohl in der  $\alpha$ - als auch in der  $\beta$ -Konfiguration angeordnet sein. Ebenso kann der Substituent in der 5-Position in der  $\alpha$ - als auch in der  $\beta$ -Konfiguration vorliegen (Nomenklatur gemäß Römpp-Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, 1992).

25 Ein weiteres vorzugsweise für die Komplexbildung verwendbares Polymer weist die folgende allgemeine Formel auf:



worin in jeder einzelnen [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N]-Einheit

5     R<sup>1</sup>     OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> bedeutet,

wobei

R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup>     unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen, bevorzugt Alkyl mit 13 bis 24 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Alkyl mit 18 Kohlenstoffatomen, bedeuten,

10

und worin

R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> (Endgruppen) unabhängig voneinander den Substituenten der Stickstoffatome der Polymerhauptkette entsprechen oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

15

wobei

20     R<sup>6</sup> (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist, beispielsweise Hydroxyl, NH<sub>2</sub>, NHR oder NR<sub>2</sub>, wobei die Reste R den Endgruppen R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> entsprechen können,

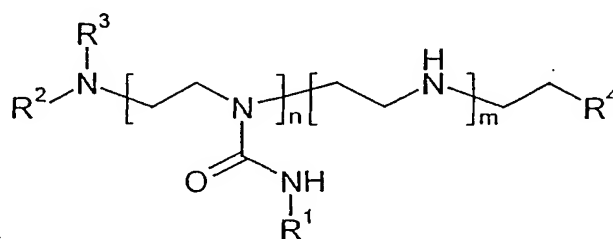
und wobei der mittlere Polymerisationsgrad P=(m+n) im Bereich 45 bis 5250, bevorzugt im Bereich 250 bis 2250, besonders bevorzugt im Bereich 500 bis 2050, liegt und n = a × P mit 0,001 < a < 0,1, vorzugsweise 0,01 < a < 0,05 und besonders bevorzugt a=0,03.

25

Dabei sind die Einheiten m und n keine Blockstrukturen, sondern statistisch im Polymer verteilt.

5 Das Polymer ist neu und als solches Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiteres vorzugsweise für die Komplexbildung verwendbares Polymer weist die folgende allgemeine Formel auf:



10

worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}]$ -Einheit

15  $\text{R}^1$  Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen, bevorzugt Alkyl mit 13 bis 24 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Alkyl mit 18 Kohlenstoffatomen, bedeutet,

und worin

20  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  (Endgruppen) unabhängig voneinander den Substituenten der Stickstoffatome der Polymerhauptkette entsprechen oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

wobei

25  $\text{R}^4$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist, beispielsweise Hydroxyl,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}$  oder  $\text{NR}_2$ , wobei die Reste R den Endgruppen  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  entsprechen können,

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250, bevorzugt im Bereich 250 bis 2250, besonders bevorzugt im Bereich 500 bis 2050, liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , vorzugsweise  $0,01 < a < 0,05$  und besonders bevorzugt  $a=0,03$ .

Dabei sind die Einheiten  $m$  und  $n$  keine Blockstrukturen, sondern statistisch im Polymer verteilt.

10 Das Polymer ist neu und als solches Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Vorzugsweise weist das Polymer ein mittleres Molekulargewicht unter 220000 g/mol, besonders bevorzugt ein Molekulargewicht zwischen 2000 und 100000 g/mol, ganz besonders bevorzugt ein Molekulargewicht zwischen 20000 und 100000 g/mol, auf.

Die hydrophoben Gruppen werden in polymeranalogen Reaktionen eingeführt, beispielsweise durch Alkylierung mit Halogenalkanen, Acylierung mit Carbonsäurechloriden, Acylierung mit Reaktivestern, Michael-Addition an  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen (Carbonsäuren, Carbonsäureamide, Carbonsäureester) oder durch Addition an Isocyanate. Es handelt sich hierbei um literaturbekannte Reaktionstypen (J. March, Advanced Organic Chemistry, Wiley, New York, 4. Auflage, 1992).

Die Herstellung der linearen Polyethylenimine erfolgt beispielsweise durch kationische Ringöffnungspolymerisation von 2-Ethyloxazolin mit kationischen Initiatoren, vorzugsweise nach einer Vorschrift von B.L. Rivas et al. (Polymer Bull. 1992, 28, 3-8). Die so erhaltenen Poly(ethyloxazoline) werden quantitativ durch Behandlung mit einer Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Wasser, vorzugsweise einer 1:1 Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Wasser, unter Abspaltung von Propan-säure in die linearen Polyethylenimine überführt. Die Reaktionstemperatur liegt vorzugsweise zwischen 80 und 100°C, besonders bevorzugt bei 100°C. Die Reaktions-

zeit liegt vorzugsweise zwischen 12 und 30 Stunden, besonders bevorzugt bei 24 Stunden. Die Reinigung des Produkts erfolgt vorzugsweise durch mehrfache Umkristallisation aus Ethanol.

- 5 Mit dem beschriebenen Verfahren lassen sich die linearen Polyethylenimine im gewünschten Molekulargewichtsbereich von 2000 bis 220000 g/mol herstellen.

Die Einführung der Alkylgruppen, wie z.B. C18-Alkylgruppen, erfolgt beispielsweise durch Reaktion einer 5 %-igen Lösung des entsprechenden linearen Polyethylenimins in absolutem Ethanol bei einer Reaktionstemperatur von 40 bis 75°C, vorzugsweise 60°C, mit Octadecylchlorid. Die Dosiermenge des Alkylchlorids orientiert sich exakt an dem gewünschten Substitutionsgrad (0,1 bis 10 %). Die Reaktionszeit beträgt vorzugsweise zwischen 10 und 24 Stunden, besonders bevorzugt 17 Stunden.

- 15 Die Einführung von Acylgruppen, wie z.B. C18 Acylgruppen, erfolgt beispielsweise durch Reaktion einer 5 %-igen Lösung des entsprechenden linearen Polyethylenimins in absolutem Ethanol bei einer Reaktionstemperatur von 40 bis 60°C, vorzugsweise 50°C, mit Octadecansäurechlorid. Die Dosiermenge des Säurechlorids orientiert sich exakt an dem gewünschten Substitutionsgrad (0,1 bis 10 %). Die Reaktionszeit beträgt vorzugsweise zwischen 10 und 24 Stunden, besonders bevorzugt 20 Stunden.

Die Einführung von Acylgruppen kann auch über eine Reaktivestermethode unter Aktivierung eines Carbonsäurederivates mit N-Hydroxysuccinimid erfolgen. Dieses Verfahren wird vorzugsweise im Fall der Polyethylenimin-Funktionalisierung mit Gallensäuren angewendet. Dazu wird beispielsweise das Gallensäure-Derivat Chenodesoxycholsäure (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholansäure), im folgenden als Substituent mit CDC abgekürzt, mit N-Hydroxysuccinimid in Dimethoxyethan als Lösungsmittel in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur, die Reaktionszeit beträgt 16 Stunden. Der so hergestellte Reaktivester wird mit einer 5 %-igen Lösung des entsprechenden linearen Polyethylenimins in absolutem Ethanol umgesetzt. Die Dosiermenge des Reaktivesters orientiert sich

exakt an dem gewünschten Substitutionsgrad (0,1 bis 10 %). Die Reaktionstemperatur liegt zwischen 20 und 60°C, vorzugsweise bei 50°C. Die Reaktionszeit beträgt vorzugsweise zwischen 10 und 24 Stunden, besonders bevorzugt 20 Stunden.

5 Die Einführung von beispielsweise Chenodesoxycholsäure in Oligoamine wie beispielsweise Spermin oder Pentaethylenhexamin über die Reaktivestermethode ist in der Literatur beschrieben (S. Walker et al. Advanced Drug Delivery Reviews 1998, 30, 61-71.). Die erfindungsgemäßen Gallensäure-substituierten Polymere weisen hydrophobe Substituenten auf, wobei sich der Grad der Hydrophobizität durch die  
10 Anzahl der Hydroxygruppen steuern lässt, analog wie in den von S. Walker et al. beschriebenen "cationic facial amphiphiles".

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe werden vorzugsweise hochgereinigte Proben eingesetzt. Dazu werden die hydrophoben linearen Polyethylenimine in Wasser bei pH 7 in einer Konzentration von 0,1 bis 1 mg/ml, vorzugsweise  
15 0,5 mg/ml, gelöst und durch eine Säulenchromatographie über Sephadex und anschließender Gefriertrocknung gereinigt. Anschließend werden die Polymere erneut in Wasser oder vorzugsweise physiologischer Kochsalzlösung unter kurzer Ultraschallbehandlung gelöst und auf pH 7 eingestellt. Die Konzentration der Polyethyleniminlösungen liegt für die Komplexherstellung vorzugsweise zwischen 0,1  
20 und 1 mg/ml, besonders bevorzugt bei 0,5 mg/ml.

Zur Charakterisierung der kationischen Polymere können Standardmethoden wie <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie, FT-IR-Spektroskopie und Zetapotentialmessungen angewendet  
25 werden.

Die für die Komplexbildung zu verwendende Nukleinsäure kann z.B. eine DNA oder RNA sein. Die Nukleinsäure kann ein Oligonukleotid oder ein Nukleinsäurekonstrukt sein. Vorzugsweise umfasst die Nukleinsäure ein oder mehrere Gene. Besonders bevorzugt stellt die Nukleinsäure ein Plasmid dar.  
30

Die Nukleinsäure kann eine Nukleotidsequenz umfassen, welche für einen pharmakologischen Wirkstoff oder dessen Vorstufe kodiert und/oder welche für ein Enzym kodiert.

- 5 Die Nukleinsäure kann eine Nukleotidsequenz umfassen, welche für ein Antigen eines Pathogens kodiert. Pathogene und relevante zugehörige Antigene sind beispielsweise: Herpes Simplex Virus (HSV-1, HSV-2) und Glykoprotein D; Humanes Immunodefizienzvirus (HIV) und Gag, Nef, Pol; Hepatitis C Virus und NS3; Anthrax und Lethal Factor, Leishmania und ImSTI1 und TSA; Tuberkulose-
- 10 Bakterien und Mtb 8.4. Grundsätzlich ist jede beliebige Nukleinsäure einsetzbar, die für ein Antigen kodiert, gegen welches eine Immunantwort erfolgt. Gegebenenfalls sind diverse für Antigene kodierende Nukleinsäuren zu kombinieren.

- 15 Die Nukleinsäure kann eine Nukleotidsequenz umfassen, welche für ein Allergen kodiert. Allergene sind beispielsweise der f2 (Hausstaubmilbe), Bet v1 (Birkenpollen), Ara h2 (Erdnuß), Hev b5 (Latex). Grundsätzlich ist jede beliebige Nukleinsäure einsetzbar, die für ein Antigen kodiert, welches im Menschen oder Tier allergischen Reaktionen hervorruft. Gegebenenfalls sind diverse für Allergene kodierende Nukleinsäuren zu kombinieren.

- 20 Die Nukleinsäure kann eine Nukleotidsequenz umfassen, welche für ein immunmodulatorisches Protein kodiert. Immunmodulatorische Proteine sind beispielsweise Zytokine (z.B. IL-4, IFN $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ ), Chemokine (z.B. MCP-1, MIP1 $\alpha$ , RANTES), Co-Stimulatoren (z.B. CD80, CD86, CD40, CD40L) oder sonstige (z.B.
- 25 Hitzeschockprotein). Auch CpG-Motive in DNA-Sequenzen weisen immunmodulatorische Eigenschaften auf.

- 30 Gegebenenfalls kann die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfassen, welche für ein Fusionsprotein aus Antigen/Allergen und immunmodulatorischem Protein kodiert.

Die Nukleinsäure umfasst vorzugsweise weiterhin Sequenzen, die dazu führen, dass ein bestimmtes Gen spezifisch, beispielsweise virusspezifisch (d.h. z.B. nur in virus-infizierten Zellen), (ziel-)zellspezifisch, metabolisch spezifisch, zellzyklusspezifisch, entwicklungsspezifisch oder aber unspezifisch exprimiert wird.

5

Im einfachsten Fall umfasst die Nukleinsäure ein Gen, welches das gewünschte Protein kodiert, und spezifische Promotorsequenzen und gegebenenfalls weitere regulatorische Sequenzen. Zur Verstärkung und/oder Verlängerung der Expression des Gens können z.B. virale Promotor- und/oder Enhancersequenzen enthalten sein.

10 Derartige Promotor- und/oder Enhancersequenzen sind beispielsweise in Dillon, TiBTech 1993, 11, 167 übersichtlich dargestellt. Beispiele hierfür sind die LTR-Sequenzen von Rous-Sarcomaviren und von Retroviren, die Promotor- und Enhancer-Region von CMV-Viren, die ITR-Sequenzen und/oder Promotorsequenzen p5, p19 und p40 von AAV-Viren, die ITR- und/oder Promotorsequenzen von

15 Adenoviren, die ITR- und/oder Promotorsequenzen von Vaccinia Viren, die ITR- und/oder Promotorsequenzen von Herpesviren, die Promotorsequenzen von Parvoviren und die Promotorsequenzen (upstream regulator region) von Papillomaviren.

Die erfindungsgemäßen Komplexe können auch Polymere umfassen, an welche

20 zellspezifischen Liganden gekoppelt sind. Solche zellspezifischen Liganden können beispielsweise derart beschaffen sein, dass sie an die äußere Membran einer Zielzelle, vorzugsweise einer tierischen bzw. menschlichen Zielzelle binden. Erfindungsgemäße Komplexe, die Liganden enthalten, können für den zielzellspezifischen Transfer einer Nukleinsäure verwendet werden. Die Zielzelle kann beispielsweise

25 eine Endothelzelle, eine Muskelzelle, ein Makrophage, ein Lymphozyt, eine Gliazelle, eine blutbildende Zelle, eine Tumorzelle, z.B. eine Leukämiezelle, eine virusinfizierte Zelle, eine Bronchialepithelzelle oder eine Leberzelle, z.B. eine sinusoidale Zelle der Leber sein. Ein Ligand, der spezifisch an Endothelzellen bindet, kann beispielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus monoklonalen

30 Antikörpern oder deren Fragmenten, die spezifisch sind für Endothelzellen, endständig Mannose tragende Glykoproteine, Glykolipide oder Polysaccharide, Zytokine,



Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle oder, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform, aus Glykoproteinen aus der Hülle von Viren, die einen Tropismus für Endothelzellen haben. Ein Ligand, der spezifisch an glatte Muskelzellen bindet, kann beispielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend monoklonale

5 Antikörper oder deren Fragmente, die spezifisch sind für Aktin, Zellmembranrezeptoren sowie Wachstumsfaktoren oder, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform, aus Glykoproteinen aus der Hülle von Viren, die einen Tropismus für glatte Muskelzellen haben. Ein Ligand, der spezifisch an Makrophagen und/oder Lymphozyten bindet, kann beispielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe

10 umfassend monoklonale Antikörper, die spezifisch sind für Membranantigene auf Makrophagen und/oder Lymphozyten, intakte Immunglobuline oder Fc-Fragmente von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern, die spezifisch sind für Membranantigene auf Makrophagen und/oder Lymphozyten, Zytokine, Wachstumsfaktoren, endständig Mannose tragende Peptide, Proteine, Lipide oder Polysaccharide oder, in

15 einer besonders bevorzugten Ausführungsform, aus Glykoproteinen aus der Hülle von Viren, insbesondere das HEF-Protein vom Influenza C-Virus mit Mutation in der Nukleotidposition 872 oder HEF-Spaltprodukte des Influenza C-Virus enthaltend die katalytische Triade Serin-71, Histidin-368 oder -369 und Asparaginsäure-261. Ein Ligand, der spezifisch an Gliazellen bindet, kann beispielsweise ausgewählt werden

20 aus der Gruppe umfassend Antikörper und Antikörperfragmente, die spezifisch an Membranstrukturen von Gliazellen binden, Adhäsionsmoleküle, endständig Mannose tragende Peptide, Proteine, Lipide oder Polysaccharide, Wachstumsfaktoren oder, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform, aus Glykoproteinen aus der Hülle von Viren, die einen Tropismus für Gliazellen haben. Ein Ligand, der spezifisch an

25 blutbildende Zellen bindet, kann beispielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend Antikörper oder Antikörperfragmente, die spezifisch sind für einen Rezeptor des stem cell factors, IL-1 (insbesondere Rezeptortyp I oder II), IL-3 (insbesondere Rezeptortyp  $\alpha$  oder  $\beta$ ), IL-6 oder GM-CSF, sowie intakte Immunglobuline oder Fc-Fragmente, die diese Spezifität aufweisen und Wachstumsfaktoren wie SCF,

30 IL-1, IL-3, IL-6 oder GM-CSF sowie deren Fragmente, die an die zugehörigen Rezeptoren binden. Ein Ligand, der spezifisch an Leukämiezellen bindet, kann bei-

spielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend Antikörper, Antikörperfragmente, Immunglobuline oder Fc-Fragmente, die spezifisch an Membranstrukturen auf Leukämiezellen binden, wie CD13, CD14, CD15, CD33, CAMAL, Sialosyl-Le, CD5, CD1e, CD23, M38, IL-2-Rezeptoren, T-Zell-Rezeptoren, CALLA oder CD19, sowie Wachstumsfaktoren oder davon abstammende Fragmente oder Retinoide. Ein Ligand, der spezifisch an virusinfizierte Zellen bindet, kann beispielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend Antikörper, Antikörperfragmente, intakte Immunglobuline oder Fc-Fragmente, die spezifisch sind für ein Virusantigen, das nach Infektion durch das Virus auf der Zellmembran der infizierten Zelle exprimiert wird. Ein Ligand, der spezifisch an Bronchialepithelzellen, sinusoidale Zellen der Leber oder Leberzellen binden kann, kann beispielsweise ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend Transferrin, Asialoglykoproteine, wie Asialoorosomucoid, Neoglykoprotein oder Galaktose, Insulin, endständig Mannose tragende Peptide, Proteine, Lipide oder Polysaccharide, intakte Immunglobuline oder Fc-Fragmente, die spezifisch an die Zielzellen binden und, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform, aus Glykoproteinen aus der Hülle von Viren, die spezifisch an die Zielzellen binden. Weitere detaillierte Beispiele für Liganden sind z.B. in EP-A 0 790 312 und EP-A 0 846 772 offenbart.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Komplexe. Beispielsweise können die Komplexe zur Einführung einer Nukleinsäure in eine Zelle bzw. Zielzelle (Transfektion), zur Herstellung eines Arzneimittels und/oder in der Gentherapie sowie der prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierung und der Toleranzinduktion bei Allergien verwendet werden. Vorzugsweise betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Komplexe zur Einführung von nichtviralen oder viralen Nukleinsäurekonstrukten in eine Zelle und die Verabreichung dieser (transfizierten) Zelle an einen Patienten zum Zwecke der Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Zelle beispielsweise eine Endothelzelle, ein Lymphozyt, ein Makrophage, eine Leberzelle, ein Fibroblast, eine Muskelzelle oder eine Epithelzelle sein kann und diese Zelle z.B. lokal auf die Haut appliziert oder subkutan, intramuskulär, in eine Wunde, in eine Körperhöhle, in ein

Organ oder in ein Blutgefäß injiziert werden kann. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Komplexe zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die erfindungsgemäßen Komplexe in üblicher Weise, vorzugsweise oral, parenteral oder topisch verabreicht werden können. Die erfindungsgemäßen Komplexe können beispielsweise perlingual, intranasal, dermal, subkutan, intravenös, intramuskulär, rektal, in eine Wunde, in eine Körperhöhle, in eine Körperöffnung, in ein Organ oder in ein Blutgefäß gegeben bzw. injiziert werden.

Gegebenenfalls kann es sinnvoll sein, die erfindungsgemäßen Komplexe mit weiteren Zusätzen zu kombinieren (Adjuvants, Anästhetikum etc.).

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Komplexierung von Nukleinsäuren vor dem Einbringen in den Patienten liegt darin begründet, dass die Bildung von anti-DNA-Antikörpern hierdurch erschwert wird. Nackte DNA, in Versuchstiere eingebracht, führte hingegen in Lupus-prone-Mäusen zu einer Erhöhung der Bildung von Autoimmunantikörpern und einer Verdreifachung der Anzahl von Autoantikörper sezernierenden B-Zellen (Klinman et al., DNA vaccines: safety and efficacy issues, in Gene Vaccination: Theory and Practice, ed. E.Raz, Springer).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer transfizierten Zelle bzw. Zielzelle, wobei die erfindungsgemäßen Komplexe mit dieser Zelle inkubiert werden. Vorzugsweise wird die Transfektion in vitro durchgeführt. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine transfizierte Zelle bzw. Zielzelle, die die erfindungsgemäßen Komplexe enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der transfizierten Zelle, beispielsweise als Arzneimittel bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels und/oder zur Gentherapie.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Arzneimittel, das die erfindungsgemäßen Komplexe und/oder eine damit transfizierte Zelle enthält.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei die erfindungsgemäßen Komplexe mit weiteren Additiven gemischt werden.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Kopplung der erfindungsgemäßen Polymere an einen zellspezifischen Liganden und die Verwendung des Kopplungsproduktes im Komplex mit einer viralen oder nicht viralen Nukleinsäure für die Einführung dieser Nukleinsäure in eine Zelle oder für die Verabreichung des Komplexes an einen Säuger zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung. Die  
10 Möglichkeiten der Herstellung und Kopplung von zellspezifischen Liganden sind bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 790 312 und DE-A 196 49 645 ausführlich beschrieben worden. Auf diese Patentanmeldungen wird ausdrücklich Bezug genommen.

15 Die erfindungsgemäßen Komplexe aus Polymer, gegebenenfalls gekoppelt mit einem zellspezifischen Liganden, und einem viralen oder nichtviralen Nukleinsäurekonstrukt, stellen ein Gentransfer-Material für die Gentherapie dar. In einer bevorzugten Ausführungsform werden diese Komplexe Patienten äußerlich oder innerlich, lokal,  
20 in eine Körperhöhle, in ein Organ, in den Blutkreislauf, in den Atemweg, in den Magen-Darm-Trakt, in den Urogenitaltrakt, oral, intranasal, intramuskulär oder subkutan verabreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zellen, insbesondere von Hefen oder Säugern, in die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komplexe ein Nukleinsäurekonstrukt eingeführt worden ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform  
25 werden die Nukleinsäurekonstrukte mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komplexe in Zelllinien eingebracht, die dann nach Transfektion zur Expression des gewählten Gens verwendet werden können. Diese Zellen können somit zur Bereitstellung eines Arzneimittels für Patienten verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist des Weiteren die Verwendung von Säugerzellen, in die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komplexe eine Nukleinsäure eingeführt worden ist, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Prophylaxe einer Erkrankung. Beispielsweise können Endothelzellen aus dem Blut gewonnen, in vitro mit den erfindungsgemäßen Komplexen behandelt und dem Patienten beispielsweise intravenös injiziert werden. Weiterhin können beispielsweise dendritische Zellen (antigenpräsentierende Zellen) aus dem Blut gewonnen, in vitro mit den erfindungsgemäßen Komplexen behandelt und zur Induktion einer prophylaktischen oder therapeutischen Immunantwort dem Patienten injiziert werden. Derartige in vitro transfizierte Zellen können auch in Kombination mit den erfindungsgemäßen Komplexen Patienten verabreicht werden. Diese Kombination beinhaltet, dass Zellen und Komplexe jeweils gleichzeitig oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten, an gleichen oder an unterschiedlichen Orten verabreicht oder injiziert werden.

Die erfindungsgemäßen Polymere werden mit der Nukleinsäure durch Vermischen beider Ausgangssubstanzen komplexiert. Das Mischungsverhältnis wird durch das angestrebte Ladungsverhältnis zwischen negativ geladener Nukleinsäure und positiv geladenem Polymer bestimmt. Aus Zetapotentialmessungen konnte ermittelt werden, dass im Falle der hydrophob funktionalisierten linearen Polyethylenimine (H-LPEI) der Protonierungsgrad bei pH 7 ca. 50 % beträgt. Das Ladungsverhältnis von DNA/Polymer kann zwischen 1:0,1 und 1:10 variieren. Das bevorzugte Ladungsverhältnis liegt zwischen 1:2 und 1:10. Bei Ladungsverhältnissen von 1:5 bis 1:10 kann bei einer DNA-Konzentration von 100 µg/ml eine Trübung bzw. Präzipitation auftreten. Falls Präzipitate entstehen, können diese vor der Applikation resuspendiert oder redispergiert werden.

Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Komplexe durch Zugabe der H-LPEI-Lösung zu der entsprechenden Nukleinsäure-Lösung hergestellt. Besonders bevorzugt sind die Konzentrationen so eingestellt, dass eine 1:1 Vol.-Mischung hergestellt wird.

Die Komplexe können durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht werden, um die Ladungsverhältnisse zu charakterisieren. Ausgewählte Komplexe können durch Rasterkraftmikroskopie untersucht werden, um Informationen über die DNA-Kondensation und die Größe der Komplexe zu erhalten.

5

Es ist überraschend, dass insbesondere hydrophobe Gruppen, die an die Polymerkette gebunden sind, trotz einer verringerten Wasserlöslichkeit besonders gute Ergebnisse zeigen und definierte kondensierte Komplexe bilden. Man musste erwarten, dass hydrophob modifizierte Polymere wie Tenside oder Emulgatoren wirken und daher nicht in der Lage sind, partikuläre Komplexe mit Nukleinsäuren zu bilden. Weiterhin war zu erwarten, dass die hydrophoben Substituenten die Oberflächencharakteristik der Nukleinsäure/Polymer-Komplexe bestimmen, was folglich zu einer erhöhten Zellmembran-Wechselwirkung und damit zu einer gesteigerten Transfektionseffizienz führt.

10

## Beispiele

### Allgemeines

5       Überraschend stellte sich heraus, dass die hydrophoben linearen Polyethylenimine, im folgenden als H-LPEI abgekürzt, in Bezug auf Wirksamkeit als Vektor für die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen und in seiner biologischen Verträglichkeit den linearen unsubstituierten Polyethylenimininen (LPEI) deutlich überlegen sind. In Mausexperimenten wurden Nukleinsäure-Komplexe enthaltend H-LPEI und DNA-  
10       Plasmid, welches das menschliche Faktor VIII (FVIII)-Protein kodiert, im Vergleich zu linearem unsubstituiertem Polyethylenimininen jeweils mit gleichem Molekulargewicht getestet. Proteinexpression konnte nur im Falle der H-LPEI-Komplexe nachgewiesen werden. Ebenso waren Transfektionsexperimente mit nackter DNA stets negativ.

15       Bei den Untersuchungen zur FVIII-Gentherapie erwiesen sich insbesondere acylierte Polyethylenimine als wirksam, vorzugsweise mit C18 Seitenkette. Der Acylierungsgrad liegt zwischen 0,1 und 10 Prozent, vorzugsweise zwischen 1 und 5 Prozent und besonders bevorzugt bei 3 Prozent. Das mittlere Molekulargewicht liegt vorzugsweise im Bereich 20 000 bis 100 000 g/Mol.

25       Weiterhin wurden insbesondere lineare Polyethylenimine mit Gallensäure-Substituenten als wirksam identifiziert, vorzugsweise mit CDC-Substituenten. Der Acylierungsgrad liegt zwischen 0,1 und 10 Prozent, vorzugsweise zwischen 1 und 5 Prozent und besonders bevorzugt bei 3 Prozent. Das Molekulargewicht liegt vorzugsweise im Bereich 20 000 bis 100 000 g/Mol.

30       Gleichzeitig wurden im Rahmen der in vivo Tests keinerlei toxische Reaktionen beobachtet.

Die Analytik und die Bestimmung der FVIII-Proteinexpression der in vivo Experimente sowie die entsprechenden Protokolle sind in den nachfolgenden Beispielen detailliert beschrieben.

5     **Beispiel 1**

Synthese der linearen Polyethylenimine (LPEI):

10     Lineare Polyethylene wurden durch kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Ethyloxazolin zu Poly(ethyloxazolin) (analog B.L. Rivas, S.I. Ananias, Polymer Bull. 1992, 28, 3-8) und anschließender saurer Hydrolyse durch Abspaltung von Propansäure synthetisiert. Bestimmte Vorläufer-Polymere (Poly(ethyloxazoline)) sind auch kommerziell erhältlich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland). Die Vorläufer-Polymere wurden durch Gelpermeationschromatographie, <sup>1</sup>H-NMR und  
15     FT-IR charakterisiert.

Eine quantitative Hydrolyse gelang durch Umsetzung von beispielsweise 24,7 g Poly(ethyloxazolin) (Mw 200000 g/mol) in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 40 ml konzentrierter Salzsäure bei 100°C. Nach 24 Stunden wurde der gebildete  
20     voluminöse Niederschlag durch Zusatz von 250 ml Wasser gelöst. Nach Abkühlen auf 20°C wurde das Produkt unter Zusatz von 20 %-iger NaOH auf pH 11 eingestellt und gefällt. Nach Absaugen und Waschen des Niederschlags (Waschwasser pH 7) wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend aus Ethanol umkristallisiert (Ausbeute 9,5 g/88 %). Hochreine Chargen  
25     (Milligramm-Mengen) wurden durch Säulenchromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia disposable PD-10 desalting column) von gesättigten wässrigen Lösungen (pH 7) des Polyethylenimins mit Millipore-Wasser als Eluent und anschließender Gefriertrocknung erhalten.

30     Die linearen Polyethylenimine wurden durch <sup>1</sup>H-NMR und FT-IR charakterisiert, wodurch die quantitative Hydrolyse bestätigt werden konnte.



**Beispiel 2**

Synthese der hydrophob funktionalisierten linearen Polyethylenimine (H-LPEI) am  
Beispiel der Einführung von 3 mol-% C18-Alkylgruppen in LPEI mit einem Mw von  
5 87000 g/Mol:

Dazu wurden 0,5 g LPEI unter Argon in 10 ml Ethanol bei 60°C gelöst und nach  
langsamer Zugabe von 0,11 g (0,13 ml) Octadecylchlorid 17 Stunden gerührt. Das  
Reaktionsprodukt wurde bei 20°C durch Zusatz von 20 ml Wasser gefällt, abfiltriert,  
10 mit Wasser gewaschen (Waschwasser pH 7) und im Hochvakuum über Phosphor-  
pentoxid getrocknet (Ausbeute 0,48 g/96 %). Hochreine Chargen (Milligramm-  
Mengen) wurden durch Säulenchromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia  
disposable PD-10 desalting column) von gesättigten wässrigen Lösungen (pH 7) des  
Polyethylenimins mit Millipore-Wasser als Eluent und anschließender Gefrier-  
15 trocknung erhalten.

Die alkylierten linearen Polyethylenimine wurden durch <sup>1</sup>H-NMR und FT-IR  
charakterisiert, wodurch der gewünschte Alkylierungsgrad bestätigt werden konnte.

20 **Beispiel 3**

Synthese der hydrophob funktionalisierten linearen Polyethylenimine (H-LPEI) am  
Beispiel der Einführung von 3 mol-% C18-Acylgruppen in LPEI mit einem Mw von  
25 87000 g/Mol:

Dazu wurden 0,5 g LPEI unter Argon in 10 ml Ethanol bei 50°C gelöst und nach  
langsamer Zugabe von 0,11 g (0,12 ml) Octadecansäurechlorid 20 Stunden gerührt.  
Die Reaktionsmischung wurde nach Filtration im Vakuum quantitativ eingeeengt. Der  
Rückstand wurde in der Hitze in 4 ml Ethanol gelöst und das Produkt wurde bei 20°C  
30 durch Zusatz von 8 ml Wasser gefällt. Nach Filtration und Waschen mit Wasser  
(Waschwasser pH 7) wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet

(Ausbeute 0,38 g/76 %). Hochreine Chargen (Milligramm-Mengen) wurden durch Säulenchromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia disposable PD-10 desalting column) von gesättigten wässrigen Lösungen (pH 7) des Polyethylenimins mit Millipore-Wasser als Eluent und anschließender Gefriertrocknung erhalten.

5

Die acylierten linearen Polyethylenimine wurden durch  $^1\text{H}$ -NMR und FT-IR charakterisiert, wodurch der gewünschte Acylierungsgrad bestätigt werden konnte.

#### Beispiel 4

10

Synthese der hydrophob funktionalisierten linearen Polyethylenimine (H-LPEI) am Beispiel der Einführung von 3 mol-% Chenodesoxycholsäure-Gruppen ( $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- $5\beta$ -cholansäure) in LPEI mit einem Mw von 87000 g/Mol:

15

20

25

30

Chenodesoxycholsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde dazu mit N-Hydroxysuccinimid in eine Reaktivester-Verbindung überführt. 1 g Chenodesoxycholsäure und 0,32 g N-Hydroxysuccinimid wurden in 5 ml Dimethoxyethan gelöst und bei 0-5°C mit 0,63 g Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 Stunden gerührt, der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Der Reaktivester wurde im Hochvakuum getrocknet (stabiler Schaum) und durch  $^1\text{H}$ -NMR charakterisiert. Ohne weitere Reinigung wurden 179 mg des Chenodesoxycholsäure-Reaktivesters bei Raumtemperatur unter Argon zu einer Lösung von 0,5 g LPEI in 10 ml Ethanol gegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 20 Stunden bei 50°C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Produkt durch Zusatz von 25 ml Wasser gefällt. Der Rückstand wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen (Waschwasser pH 7) und im Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. (Ausbeute 0,41 g/82 %). Hochreine Chargen (Milligramm-Mengen) wurden durch Säulenchromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia disposable PD-10 desalting column) von gesättigten wässrigen Lösungen (pH 7) des Polyethylenimins mit Millipore-Wasser als Eluent und anschließender Gefriertrocknung erhalten.

Die mittels Reaktivester-Methode Acyl-funktionalisierten linearen Polyethylenimine wurden durch  $^1\text{H}$ -NMR und FT-IR charakterisiert, wodurch der gewünschte Acylierungsgrad bestätigt werden konnte.

5     **Beispiel 5**

Zetapotentialmessungen:

10     Zur Ermittlung der Ladung bzw. des Protonierungsgrades der linearen Polyethylenimine und der hydrophob funktionalisierten Polyethylenimine in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert wurden Zetapotentialmessungen durchgeführt. Unabhängig vom mittleren Molekulargewicht und unabhängig vom Polymertyp ließ sich bei pH 7 ein mittlerer Protonierungsgrad von 50 % ermitteln, d.h. ca. 50 % der Stickstoffatome liegen in wässriger Lösung bei pH 7 protoniert vor.

15

**Beispiel 6**

Präparation der Polynukleotid/Polymer-Komplexe:

20     Ziel war die Herstellung von Polynukleotid/Polymer-Komplexen am Beispiel der Komplexierung des FVIII-Plasmids pCY2 mit unterschiedlichen Polynukleotid-/Polymerladungsverhältnissen (1:0,1 bis 1:10) und einer konstanten Polynukleotid-Konzentration von 250  $\mu\text{g/ml}$ . Die Ladungsverhältnisse und die korrespondierenden Konzentrationen lassen sich auf Basis der in Beispiel 5 vorgestellten Zetapotential-

25     messungen kalkulieren.

Das Plasmid pCY2 ist in der Literatur beschrieben (C.R. Ill, C.Q. Yang, S.M. Budlingmaier, J.N. Gonzales, D.S. Burns, R.M. Bartholomew and P. Scuderi, Blood Coagulation and Fibrinolysis 1997, 8(2), 23-30). PCY2 ist 9164 Bp lang und enthält

30     den "thyroid hormone binding globulin" Promotor, zwei Kopien des alpha-1 Microglobulin/Bikunin-Enhancers und den 5'-Bereich eines Kaninchen beta-Globulingen-

Introns, welches die Expression eines humanen B-Region-deletierten FVIII-Gens steuert. Das Plasmid enthält weiterhin ein Ampicillin-Antibiotikaresistenz-Gen, den ColEI-Replikationsursprung und eine polyA-Stelle.

5 Von allen Polyethylenimin (LPEI, H-LPEI) wurden Stammlösungen sowohl in Wasser als auch in physiologischer Kochsalzlösung bei pH 7 mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml hergestellt. Dazu wurden 25 mg des LPEI bzw. des H-LPEI unter Erhitzen und kurzer Ultraschallbehandlung in 30 ml Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst, mit 0,1 N HCl auf pH 7 eingestellt und auf ein Endvolumen  
10 von 50 ml aufgefüllt. Die Stammlösungen wurden steril filtriert (0,2 µm) und können bei 20°C über lange Zeit gelagert werden. Aus den Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt (je 1 ml, Tabelle 1) die durch Umsetzung mit Polynukleotidlösungen der Konzentration 500 µg/ml im Volumenverhältnis 1:1 zu einem Polynukleotid-Komplex mit definierter Ladung und einer Polynukleotid-Konzentration  
15 von 250 µg/ml führen (Tabelle 2). Bei Standardexperimenten wurde häufig ein Volumen von 300 µl der Polynukleotid/LPEI- bzw. Polynukleotid/H-LPEI-Lösung gewählt. Bei Komplexen mit hohem Polyethylenimin-Anteil können Präzipitate auftreten, die vor der jeweiligen Applikation resuspendiert oder redispergiert werden können.

20 Die Polymerlösungen wurden bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen zu den Polynukleotid-Lösungen pipettiert und anschließend im Vortex gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Polynukleotid/Polymer-Komplexe bei 4°C gelagert, die Lagerstabilität der Komplexe erstreckte  
25 sich über mehrere Wochen. Für die Tierexperimente können die Komplexlösungen wie gewünscht verdünnt werden.

**Tabelle 1:** Herstellung von Verdünnungsreihen aus LPEI- bzw. H-LPEI- Stammlösungen

LPEI, H-LPEI	LPEI, H-LPEI Stammlösung $c = 500 \mu\text{g/ml}$	Wasser oder phys. NaCl- Lösung	Gesamtvolumen
$c / \mu\text{g/ml}$	$V / \mu\text{l}$	$V / \mu\text{l}$	$V / \mu\text{l}$
19	38	962	1000
47	95	905	1000
95	189	811	1000
142	284	716	1000
189	378	622	1000
378	756	244	1000

**Tabelle 2:** Übersicht über die Präparation von Polynukleotid/LPEI- bzw. H-LPEI-Komplexen (wässrige Lösungen) mit unterschiedlichen Ladungsverhältnissen für in vivo-Experimente und für die gelelektrophoretische Untersuchungen

Polynukleotid/-Polymer-Ladungsverhältnis	LPEI/H-LPEI		Wasser oder phys. NaCl-Lsg.	Poly-nukleotid c = 500 µg/ml	Polynukleotid c = 1000 µg/ml	Komplex
	c/µg/ml	V / µl	V / µl	V / µl	V / µl	V <sub>gesamt</sub> / µl
1 : 0,1	19	150	0	150	0	300
1 : 0,25	47	150	0	150	0	300
1 : 0,5	95	150	0	150	0	300
1 : 0,75	142	150	0	150	0	300
1 : 1	189	150	0	150	0	300
1 : 2	378	150	0	150	0	300
1 : 3	500	170	55	0	75	300

### Beispiel 7

Charakterisierung der Polynukleotid/Polymer-Komplexe durch Gelelektrophorese:

- 5 Das Komplexierungsverhalten der Polymere und die Ladungssituation der Polynukleotid/Polymer-Komplexe wurde durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Gele wurden jeweils aus 0,4 g Agarose und 40 ml Trisacetat-Puffer (0,04 M, pH 8,3 mit 0,01 M EDTA) hergestellt (Dicke ca. 0,6 cm). Proben bestehend aus 4 µl Polynukleotid/Polymer-Komplex ( $c = 250 \mu\text{g/ml}$ ), 9,5 µl Wasser (Millipore) sowie
- 10 1,5 µl Stoppmix wurden im Vortex vermischt und quantitativ in die Geltaschen überführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel bei einem Strom von 100 bis 150 mA (110 V). Zum Vergleich wurde in jedem Gelelektrophorese-Lauf zusätzlich ein DNA-Marker (PeqLab, 1 kb Ladder) und nacktes (nicht komplexiertes) Polynukleotid analysiert.
- 15 Nach Entwicklung des Gels in einer wässrigen Lösung von Ethidiumbromid und Bestrahlung bei 254 nm wurde die Lokalisation der DNA-Banden visualisiert. Im Falle des FVIII-Plasmids sind 2 Banden sichtbar, die der supercoiled und der zirkulären Form des Plasmids entsprechen und in Richtung der Anode wanderten.
- 20 LPEI und H-LPEI waren mit Ethidiumbromid nicht detektierbar. Zunehmender Polymeranteil in den Komplexen führte zu einer partiellen, noch unvollständigen Retardierung des Plasmids am Auftragsort. Komplexe ab einem Polynukleotid/Polymer-Ladungsverhältnis von 1:1 waren nicht mehr detektierbar, d.h. eine Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA war nicht mehr möglich. Es ist anzunehmen, dass
- 25 die kompaktierte DNA ab einem Ladungsverhältnis von 1:1 bereits als polymer-verkapselte Partikel vorliegt. Die gelelektrophoretischen Ergebnisse sind unabhängig vom Typ (Molekulargewicht, Substitution) der untersuchten linearen Polyethylenimine. Die kalkulierten Ladungsverhältnisse (siehe Beispiel 5) lassen sich durch Gelelektrophorese bestätigen.

**Beispiel 8**

Charakterisierung der Polynukleotid/Polymer-Komplexe durch Rasterkraftmikroskopie (AFM):

5

Ausgewählte Polynukleotid/Polymer-Komplexe, die in wässriger Lösung präpariert wurden, wurden durch AFM (Digital Instruments) charakterisiert. Dazu wurden die Lösungen der Komplexe auf eine Konzentration von 0,5 bis 1 µg/ml mit Wasser verdünnt und zwischen 1 und 5 µl der verdünnten Lösungen auf ein Silicium-Substrat pipettiert. Nach Verdampfen des Wasser (ca. 5 min) wird die Probe im AFM analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass ab einem Polynukleotid/Polymer-Verhältnis von 1:0,15 DNA-Kondensation und Partikelbildung stattfindet, wobei die Partikelgröße im Bereich von 100 bis 200 nm liegt.

10

15 **Beispiel 9**

In vivo Transfektionsexperimente mit hydrophob funktionalisierten Polyethylenimin (H-LPEI):

20 Die Polynukleotid/Polymer-Komplexe wurden mit dem für FVIII kodierenden Plasmid pCY2 hergestellt.

Es wurden weibliche C57Bl/6-Mäuse verwendet, die 5-6 Wochen alt waren und jeweils ungefähr 20 g wogen. Die Mäuse wurden von Simonsen Labs Inc, USA erworben.

25

In den Experimenten wurden 5 Mäuse/Gruppe verwendet und über die Schwanzvene mit entweder 50 µg Plasmid-DNA allein oder 50 µg Plasmid-DNA + Polymer in 200 µl/Tier injiziert. Das DNA : Polymer-Ladungsverhältnis betrug 1:0,5. In nachfolgenden Experimenten wurden 10 Mäuse/Gruppe und verschiedene Ladungs-

30



verhältnisse von DNA : Polymer/LPEI bzw. Polymer/H-LPEI verwendet. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Injektion retro-orbital geblutet.

5 Plasma-Proben dieser Tiere wurden unter Verwendung eines modifizierten FVIII-Aktivitätstests untersucht. Das Plasma wurde zuerst 1:4 in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung verdünnt, bevor es in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die mit dem monoklonalen Maus-Antikörper C7F7 beschichtet waren, überführt wurde. Der C7F7-Antikörper ist spezifisch für die leichte Kette des humanen FVIII und reagiert nicht mit Maus-FVIII. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Platte  
10 zweimal mit PBS enthaltend 0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach wurden die Reagenzien und Testbedingungen, wie vom Hersteller des "Coatest-Kits" (Diapharma Inc., Schweden) beschrieben, verwendet. Der letzte Testschritt bestand in der Bestimmung der optischen Dichte bei 405/450 nm. Alle FVIII-Werte wurden ausgehend von einer Standard-Kurve, die durch Zufügen von rekombinantem  
15 humanen FVIII zu dem verdünnten Maus-Plasma erstellt wurde, extrapoliert (Kalibrierung gezeigt in Tabelle 3).

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 gezeigt.

20 FVIII-Aktivitätstest (C7F7 modifizierter "Coatest"):

Reagenzien und Puffer:

Beschichtungs-Puffer: Entweder Sigma P-3813, pH 7,4 oder 0,1 M Hydrogencarbonat-Puffer pH 9,2;

Blockierungs-Puffer: 1x Coatest-Pufferlösung + 0,8 % BSA + 0,05 % Tween 20;

25 Wasch-Puffer: 20 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,05 % Tween 20 pH 7,2, Filtrieren vor Gebrauch;

Inkubations-Puffer: Blockierungs-Puffer ohne Tween 20;

Coatest VIII: C/4-Testkit: Chromogenix AB, #82-19-18-63/2

**Verfahren:**

1. Beschichten einer Immulon-Platte mit 96 Vertiefungen mit 5 µg/ml C7F7 in Beschichtungs-Puffer (100 µl/Vertiefung) bei 4°C über Nacht;  
5
2. 3 x Waschen; Zufügen von Blockierungs-Puffer (100 µl/Vertiefung); Inkubation bei 37°C für mindestens 1 Stunde;
3. 3 x Waschen; Zufügen der in Blockierungs-Puffer (100 µl/Vertiefung);  
10 verdünnten Proben; Inkubation bei 37°C für 1 -2 Stunden;
4. 3 x Waschen; Zufügen von Inkubationspuffer (25 µl/Vertiefung); danach Zufügen der "Coatest-Reagenzien" (Kit: 50 µl/Vertiefung von gemischtem FIXa, FX + Phospholipid); Befolgen der Mischungsanweisungen des Kits;  
15 Inkubation bei 37°C für 5 Minuten; danach Zugabe von 50 µl des Substrats S-222 zu jeder Vertiefung und Inkubation bei 37°C für 5 Minuten, oder 10 Minuten für Werte im niedrigeren Bereich (die 4. Stufe kann in einem Heizblock mit Schüttler durchgeführt werden);
- 20 5. Stop-Reaktion mit 2 %iger Zitronensäure (50 µl/Vertiefung);
6. O.D.-Messung bei 405-450 nm.

**Beispiel 10**

25

Vergleichsexperimente (Tabelle 5a,b):

In vivo Vergleichsexperimente mit dem nacktem FVIII-Plasmid pCY2 waren stets negativ, d.h. es konnte keine Proteinexpression nachgewiesen werden. In Vergleichs-  
30 experimenten mit Plasmid/Polymer-Komplexen auf Basis unsubstituierter linearer Polyethylenimine (LPEI) mit drei unterschiedlichen Molekulargewichtsverteilungen

(Mw 22000, 87000, 217000 g/Mol) und einem Plasmid/LPEI-Ladungsverhältnis von beispielsweise 1:0,5 (IV-Injektion von 200 µl, c = 250 µg/ml bezogen auf DNA) konnte ebenfalls keine Proteinexpression nachgewiesen werden.

5 **Tabelle 3:** UV/Vis-spektroskopische Kalibrierung der FVIII-Protein-Standards  
(Doppelbestimmung)

Standard	FVIII-Konz./ ng/ml	Position (MTP-Format)	Optische Dichte (O.D.)	O.D. Mittelwert
STD01	23,00	A1	1,289	1,289
		A2	1,149	
STD02	11,50	B1	1,037	0,993
		B2	0,949	
STD03	5,750	C1	0,687	0,652
		C2	0,617	
STD04	2,875	D1	0,456	0,43
		D2	0,404	
STD05	1,438	E1	0,293	0,277
		E2	0,261	
STD06	0,719	F1	0,182	0,171
		F2	0,160	
STD07	0,359	G1	0,121	0,117
		G2	0,114	
STD08	0,179	H11	0,104	0,110
		H12	0,115	
STD09	0,000	H1	0,058	0,059
		H2	0,060	

**Tabelle 4a:** FVIII-Genexpression nach Injektion von DNA/Polymer-Komplexen:  
**Gruppe 1**, 5 Mäuse (1a-1e), Polymer: H-LPEI, Mw 86980, C18, Acyl,  
 3 mol% (\*Verdünnungsfaktor 4)

Gruppe 1	Optische Dichte (O.D.)*	O.D. Mittelwert	FVIII-Konz./ ng/ml	FVIII-Konz. / ng/ml (Mittelwert)
1a	0,219	0,198	3,435	2,950
	0,177		2,464	
1b	0,075	0,079	0,221	0,298
	0,082		0,376	
1c	0,075	0,075	0,221	0,210
	0,074		0,198	
1d	0,090	0,085	0,551	0,430
	0,079		0,310	
1e	0,070	0,071	0,107	0,119
	0,071		0,130	

**Tabelle 4b:** FVIII-Genexpression nach Injektion von DNA/Polymer-Komplexen:  
**Gruppe 2,** 5 Mäuse (2a-2e), Polymer: H-LPEI, Mw 86980, CDC, 3  
 mol% (\*Verdünnungsfaktor 4)

Gruppe 2	Optische Dichte (O.D.)*	O.D. Mittelwert	FVIII-Konz./ ng/ml	FVIII-Konz. / ng/ml (Mittelwert)
2a	0,066	0,066	<<<<<	0
	0,065		<<<<<	
2b	0,076	0,077	0,243	0,265
	0,078		0,288	
2c	0,067	0,064	<<<<<	0
	0,061		<<<<<	
2d	0,076	0,073	0,243	0,175
	0,070		0,107	
2e	0,087	0,082	0,485	0,364
	0,076		0,242	

**Tabelle 5a:** FVIII-Genexpression nach Injektion von nackter DNA: **Gruppe 3, 5**  
Mäuse (DNA1-DNA5), (\*Verdünnungsfaktor 4)

<b>Gruppe 3</b>	<b>Optische Dichte (O.D.)*</b>	<b>O.D. Mittelwert</b>	<b>FVIII-Konz./ ng/ml</b>	<b>FVIII-Konz. / ng/ml (Mittelwert)</b>
<b>DNA1</b>	0,065	0,063	<<<<<<	0
	0,062		<<<<<<	
<b>DNA2</b>	0,063	0,061	<<<<<<	0
	0,059		<<<<<<	
<b>DNA3</b>	0,056	0,057	<<<<<<	0
	0,058		<<<<<<	
<b>DNA4</b>	0,062	0,062	<<<<<<	0
	0,062		<<<<<<	
<b>DNA5</b>	0,065	0,065	<<<<<<	0
	0,065		<<<<<<	

**Tabelle 5b:** FVIII-Genexpression nach Injektion von DNA/Polymer-Komplexen:  
**Gruppe 4,** 5 Mäuse (4a-4e), Polymer: LPEI, Mw 86980 g/Mol, unsubstituiert (\*Verdünnungsfaktor 4)

Gruppe 4	Optische Dichte (O.D.)*	O.D. Mittelwert	FVIII-Konz./ ng/ml	FVIII-Konz. / ng/ml (Mittelwert)
4a	0,063	0,061	<<<<<<	0
	0,059		<<<<<<	
4b	0,059	0,059	<<<<<<	0
	0,060		<<<<<<	
4c	0,066	0,065	<<<<<<	0
	0,064		<<<<<<	
4d	0,069	0,068	<<<<<<	0
	0,067		<<<<<<	
4e	0,089	0,086	<<<<<<	0,412
	0,082		<<<<<<	

5

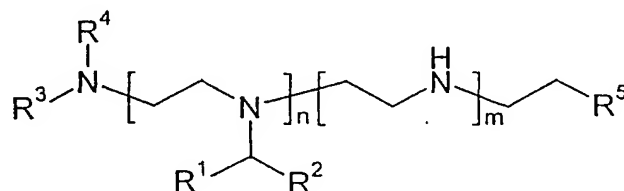
### **Beispiel 11**

Um das Verhalten der Polynukleotid/Polymer-Komplexe bei pH-Änderung zu testen und damit den Einfluss des endosomal-lysosomalen Kompartiments der Zelle zu simulieren, wurden Agarose-Gelelektrophorese-Studien in unterschiedlichen Puffersystemen und damit unter variablen pH-Bedingungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass beim Übergang von pH 8,3 (TAE-Puffer) zu pH 5,9 (MES-Puffer) der Grad der Komplexbildung abnimmt, was einer partiellen Freisetzung gleichkommt.

10

**Patentansprüche**

1. Komplex umfassend ein in Wasser lösliches oder dispergierbares lineares kationisches Polymer mit hydrophoben Substituenten und zumindest eine Nukleinsäure.
2. Komplex gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein Polyamin darstellt.
3. Komplex gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polyamin ein Polyethylenimin darstellt.
4. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten als Seitenketten oder endständig an dem Polymer angeordnet sind.
5. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten Alkylketten, Acylketten oder Steroid-artige Substituenten sind, sowie hydrophobe Substituenten, die durch Addition der Stickstoff-funktionen der Polymerhauptkette an Isocyanate oder an  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen eingeführt werden können.
6. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer die folgende allgemeine Formel aufweist:



worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}]$ -Einheit



$R^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet und

$R^2$  Alkyl mit 1 bis 23 Kohlenstoffatomen bedeutet,

5 und worin

$R^3$  und  $R^4$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff und Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

10

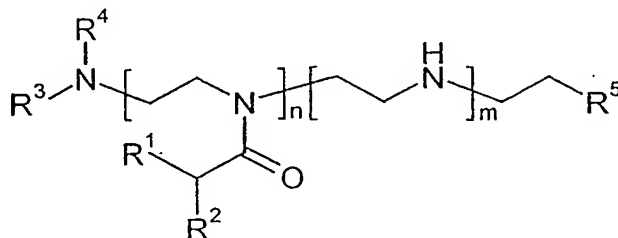
wobei

$R^5$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

15

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

7. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass  
20 das Polymer die folgende allgemeine Formel aufweist:



worin in jeder einzelnen  $[CH_2-CH_2-N]$ -Einheit

25

$R^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet und

$R^2$  Alkyl mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen bedeutet,

und worin

5  $R^3$  und  $R^4$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff oder Acyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

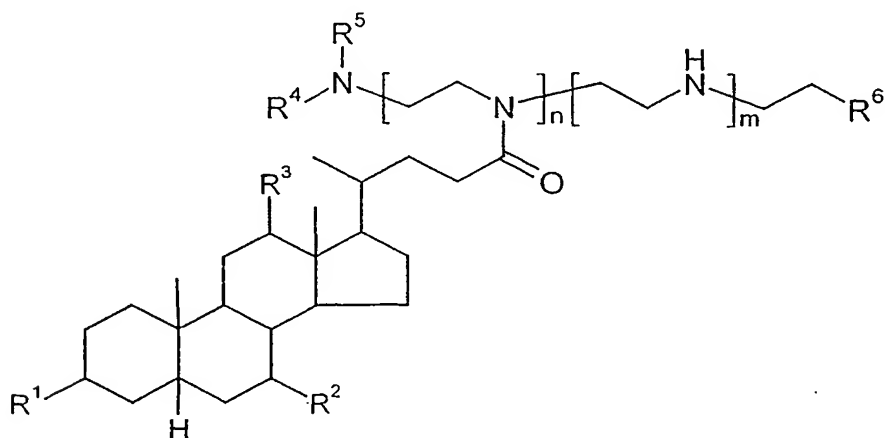
wobei

10

$R^5$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch  
15 im Polymer verteilt sind.

8. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer die folgende allgemeine Formel aufweist:



20

worin in jeder einzelnen  $[CH_2-CH_2-N]$ -Einheit

$R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  Wasserstoff oder Hydroxy bedeuten,

und worin

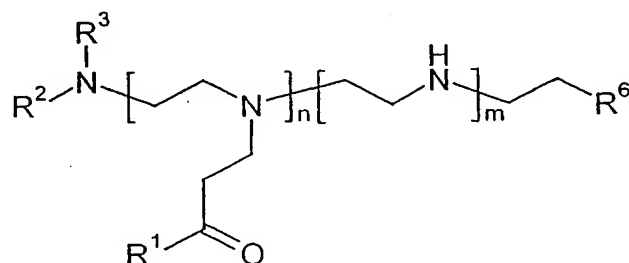
$R^4$  und  $R^5$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff oder Gallensäuren bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

wobei

$R^6$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

9. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer die folgende allgemeine Formel aufweist:



worin in jeder einzelnen  $[CH_2-CH_2-N]$ -Einheit

$R^1$  OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> bedeutet,

wobei

$R^4$  und  $R^5$  unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeuten,

und worin

5

$R^2$  und  $R^3$  (Endgruppen) unabhängig voneinander den Substituenten der Stickstoffatome der Polymerhauptkette entsprechen oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

10

wobei

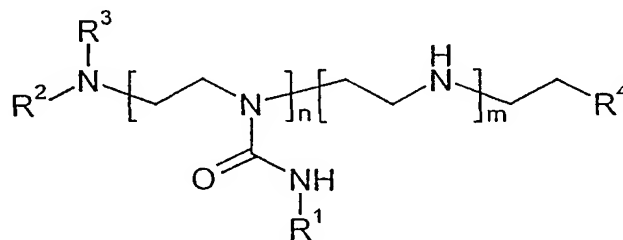
$R^6$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

15

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

10. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer die folgende allgemeine Formel aufweist:

20



worin in jeder einzelnen  $[CH_2-CH_2-N]$ -Einheit

25

$R^1$  Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeutet,

und worin

$R^2$  und  $R^3$  (Endgruppen) unabhängig voneinander den Substituenten der Stickstoffatome der Polymerhauptkette entsprechen oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

5

wobei

$R^4$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

10

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

15

11. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein mittleres Molekulargewicht unter 220000 g/Mol aufweist.

12. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein Molekulargewicht von 2000 bis 100000 g/Mol aufweist.

20

13. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer an einen zellspezifischen Liganden gekoppelt ist.

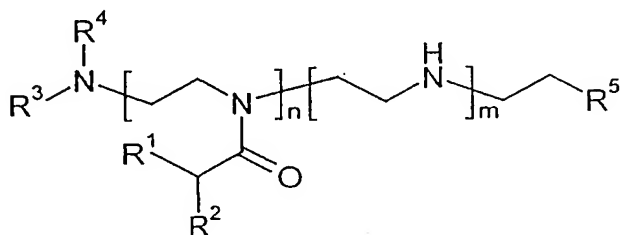
14. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure ein Plasmid darstellt.

25

15. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die für einen pharmakologischen Wirkstoff kodiert.

16. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein Antigen, Allergen oder immunmodulatorisches Protein kodiert.
- 5 17. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Ladungsverhältnis von Nukleinsäure/Polymer zwischen 1:0,1 und 1:10, insbesondere zwischen 1:2 und 1:10 liegt.
- 10 18. Verfahren zum Herstellen eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man eine entsprechende Menge des in wässriger Lösung vorliegenden Polymeren mit einer entsprechenden Menge einer Nukleinsäure-Lösung mischt.
- 15 19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Mischung anschließend getrocknet wird.
- 20 20. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Verwendung als Arzneimittel.
- 20 21. Mittel enthaltend einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 und weitere Zusätze.
- 25 22. Verwendung eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Einführung einer Nukleinsäure in eine Zelle.
23. Zelle enthaltend einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.
24. Mittel enthaltend eine Zelle gemäß Anspruch 23 und weitere Zusätze.
- 30 25. Verwendung eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Gentherapie.

26. Verwendung eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Vakzinierung.
27. Verwendung eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Toleranzinduktion bei Allergien.
28. Polymer der allgemeinen Formel



10

worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}]$ -Einheit

$\text{R}^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet und

15

$\text{R}^2$  Alkyl mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen bedeutet,

und worin

20

$\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff oder Acyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

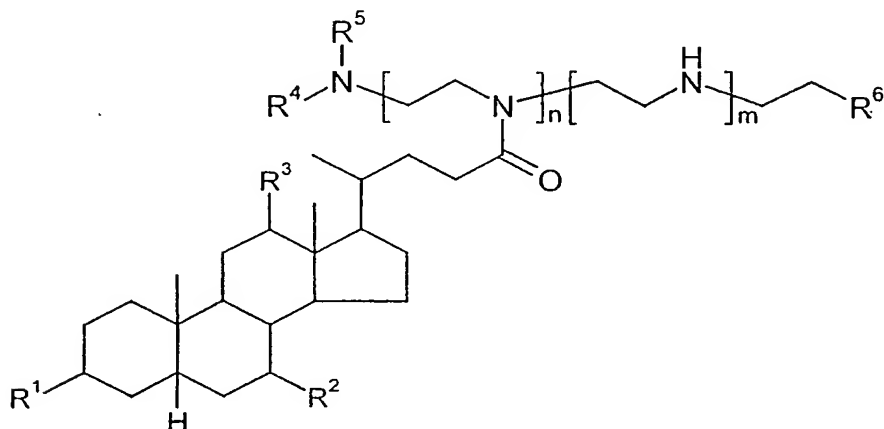
wobei

25

$\text{R}^5$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

5      29. Polymer der allgemeinen Formel



worin in jeder einzelnen  $[CH_2-CH_2-N]$ -Einheit

10

$R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  Wasserstoff oder Hydroxy bedeuten,

und worin

15

$R^4$  und  $R^5$  (Endgruppen) unabhängig voneinander Wasserstoff oder Gallensäuren bedeuten, oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

wobei

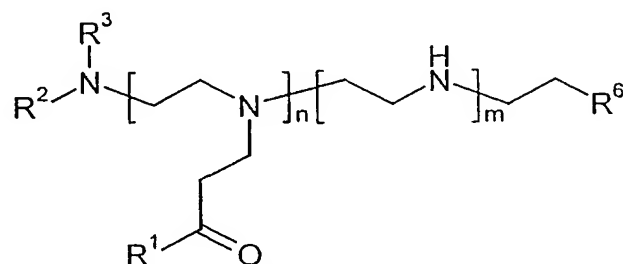
20

$R^6$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,



und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

5 30. Polymer der allgemeinen Formel



worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}]$ -Einheit

10

$\text{R}^1$   $\text{OR}^4$  oder  $\text{NR}^4\text{R}^5$  bedeutet,

wobei

15

$\text{R}^4$  und  $\text{R}^5$  unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeuten,

und worin

20

$\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  (Endgruppen) unabhängig voneinander den Substituenten der Stickstoffatome der Polymerhauptkette entsprechen oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

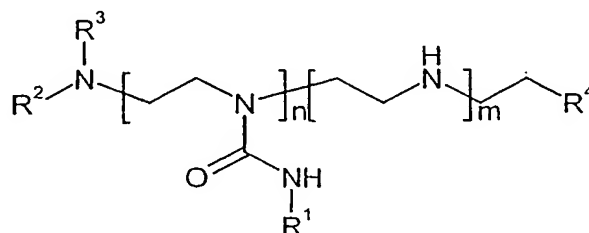
wobei

25

$\text{R}^6$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

5 31. Polymer der allgemeinen Formel



worin in jeder einzelnen  $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}]$ -Einheit

10

$\text{R}^1$  Alkyl mit 1 bis 24 Kohlenstoffatomen bedeutet,

und worin

15

$\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  (Endgruppen) unabhängig voneinander den Substituenten der Stickstoffatome der Polymerhauptkette entsprechen oder eine vom Initiator abhängige Struktur aufweisen,

wobei

20

$\text{R}^4$  (Endgruppe) ein von der Abbruchreaktion abhängiger Substituent ist,

und wobei der mittlere Polymerisationsgrad  $P=(m+n)$  im Bereich 45 bis 5250 liegt und  $n = a \times P$  mit  $0,001 < a < 0,1$ , wobei die Einheiten  $m$  und  $n$  statistisch im Polymer verteilt sind.

25

32. Polymer gemäß einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Molekulargewicht unter 220000 g/Mol aufweist.
33. Polymer gemäß Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Molekulargewicht von 2000 bis 100000 g/Mol aufweist.
- 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No

PCT/EP 01/11317

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48 C08G73/02 C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C08G C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 08711 A (CHIRON CORP) 25 February 1999 (1999-02-25) page 8, line 28 -page 19, line 12; examples 2,6-13; tables 1,2 ---	1,2, 11-27
X	BEHR J-P ET AL: "EFFICIENT GENE TRANSFER INTO MAMMALIAN PRIMARY ENDOCRINE CELLS WITH LIPOPOLYAMINE-COATED DNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 86, 1 September 1989 (1989-09-01), pages 6982-6986, XP002057565 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung, page 6982, right-hand column -page 6984, left-hand column; figure 1 --- -/--	1-4, 11-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2002

Date of mailing of the international search report

13/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

G. Willière

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte on Application No

PCT/EP/11317

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU X ET AL: "LIPOPHILIC POLYLYSINES MEDIATE EFFICIENT DNA TRANSFECTION IN MAMMALIAN CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1065, no. 1, 31 May 1991 (1991-05-31), pages 8-14, XP000197616 ISSN: 0005-2736 the whole document ----	1-5, 11-27
X	EP 1 018 543 A (BASF AG) 12 July 2000 (2000-07-12) claim 1; examples 1,3,5,8,10,12 ----	28
X	EP 0 987 029 A (TRANSGENE SA) 22 March 2000 (2000-03-22) column 3, line 30 -column 4, line 1; claims 1,2 ----	1,2,11, 12,14-27
A	KIM J-S ET AL: "In vitro gene expression on smooth muscle cells using a terplex delivery system" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 47, no. 1, 7 July 1997 (1997-07-07), pages 51-59, XP004091193 ISSN: 0168-3659 the whole document ----	1-27
X	GEALL A J ET AL: "The regiochemical distribution of positive charges along cholesterol polyamine carbamates plays significant roles in modulating DNA binding affinity and lipofection" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 459, no. 3, 15 October 1999 (1999-10-15), pages 337-342, XP004260375 ISSN: 0014-5793 page 339, paragraph 2.4; figure 1 ----	1-5, 11-27
X	FUJIWARA T ET AL: "Gene transfection activities of amphiphilic steroid-polyamine conjugates" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1468, no. 1-2, 29 September 2000 (2000-09-29), pages 396-402, XP004273333 ISSN: 0005-2736 the whole document -----	1-5, 11-27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/11317

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9908711	A	25-02-1999	US 6197332 B1	06-03-2001
			EP 1003558 A1	31-05-2000
			JP 2001515051 T	18-09-2001
			WO 9908711 A1	25-02-1999
EP 1018543	A	12-07-2000	DE 19900458 A1	13-07-2000
			CN 1260357 A	19-07-2000
			EP 1018543 A1	12-07-2000
			JP 2000204160 A	25-07-2000
EP 0987029	A	22-03-2000	EP 0987029 A1	22-03-2000
			AU 4472799 A	16-03-2000
			JP 2000135082 A	16-05-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K47/48 C08G73/02 C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

# B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C08G C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

# C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 08711 A (CHIRON CORP) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Seite 8, Zeile 28 -Seite 19, Zeile 12; Beispiele 2,6-13; Tabellen 1,2 ---	1,2, 11-27
X	BEHR J-P ET AL: "EFFICIENT GENE TRANSFER INTO MAMMALIAN PRIMARY ENDOCRINE CELLS WITH LIPOPOLYAMINE-COATED DNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 86, 1. September 1989 (1989-09-01), Seiten 6982-6986, XP002057565 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung, Seite 6982, rechte Spalte -Seite 6984, linke Spalte; Abbildung 1 --- -/-	1-4, 11-27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/02/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

G. Willièrè

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ZHOU X ET AL: "LIPOPHILIC POLYLYSINES MEDIATE EFFICIENT DNA TRANSFECTION IN MAMMALIAN CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, Bd. 1065, Nr. 1, 31. Mai 1991 (1991-05-31), Seiten 8-14, XP000197616 ISSN: 0005-2736 das ganze Dokument ---	1-5, 11-27
X	EP 1 018 543 A (BASF AG) 12. Juli 2000 (2000-07-12) Anspruch 1; Beispiele 1,3,5,8,10,12 ---	28
X	EP 0 987 029 A (TRANSGENE SA) 22. März 2000 (2000-03-22) Spalte 3, Zeile 30 -Spalte 4, Zeile 1; Ansprüche 1,2 ---	1,2,11, 12,14-27
A	KIM J-S ET AL: "In vitro gene expression on smooth muscle cells using a terplex delivery system" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 47, Nr. 1, 7. Juli 1997 (1997-07-07), Seiten 51-59, XP004091193 ISSN: 0168-3659 das ganze Dokument ---	1-27
X	GEALL A J ET AL: "The regiochemical distribution of positive charges along cholesterol polyamine carbamates plays significant roles in modulating DNA binding affinity and lipofection" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 459, Nr. 3, 15. Oktober 1999 (1999-10-15), Seiten 337-342, XP004260375 ISSN: 0014-5793 Seite 339, Absatz 2.4; Abbildung 1 ---	1-5, 11-27
X	FUJIWARA T ET AL: "Gene transfection activities of amphiphilic steroid-polyamine conjugates" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, Bd. 1468, Nr. 1-2, 29. September 2000 (2000-09-29), Seiten 396-402, XP004273333 ISSN: 0005-2736 das ganze Dokument -----	1-5, 11-27



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

die zur Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/EP 11317

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9908711 A	25-02-1999	US 6197332 B1 EP 1003558 A1 JP 2001515051 T WO 9908711 A1	06-03-2001 31-05-2000 18-09-2001 25-02-1999
EP 1018543 A	12-07-2000	DE 19900458 A1 CN 1260357 A EP 1018543 A1 JP 2000204160 A	13-07-2000 19-07-2000 12-07-2000 25-07-2000
EP 0987029 A	22-03-2000	EP 0987029 A1 AU 4472799 A JP 2000135082 A	22-03-2000 16-03-2000 16-05-2000